

上海茁彩生物科技有限公司
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0822

Size: 50T/48S

二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (Rubisco) 检测试剂盒说明书

紫外分光光度法

*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

一、测定意义:

核酮糖-1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶 (Rubisco, EC 4.1.1.39) 是植物光合作用中的一个关键酶,既控制着 CO₂ 的固定,同时又制约着碳素向 Calvin 循环和光呼吸循环分流,其活性的大小直接影响着光合速率。

二、测定原理:

- (1) 在 Rubisco 的催化下,1 分子的核酮糖-1,5-二磷酸 (RuBP) 与 1 分子的 CO₂ 结合,产生 2 分子的 3-磷酸甘油酸 (PGA);
- (2) PGA 可通过外加的 3-磷酸甘油酸激酶和甘油醛-3-磷酸脱氢酶的作用,产生甘油醛-3-磷酸,伴随着 NADH 氧化生成 NAD⁺;
- (3) 在 340 nm NADH 有特征吸收峰,而 NAD⁺ 没有此吸收峰,因此测定 340nm 吸光度下降速率可以代表 Rubisco 的羧化酶活性。

三、需自备的仪器和用品:

可见-紫外分光光度计、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

四、试剂的组成和配置：

| 种类 | 试剂规格 | 储存条件 | 使用方法及注意事项 |
|-----|----------|--------|---------------------------------------|
| 提取液 | 50mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂一 | 50mL×1 瓶 | 4℃保存 | |
| 试剂二 | 粉剂×1 瓶 | -20℃保存 | |
| 试剂三 | 粉剂×1 瓶 | -20℃保存 | 临用前加入 1.75mL 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂 4℃保存一周； |
| 试剂四 | 粉剂×1 瓶 | -20℃保存 | 临用前加入 1.75mL 蒸馏水充分溶解待用；用不完的试剂 4℃保存一周 |

五、操作步骤：

● 粗酶液制备：

按照组织质量 (g) : 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。10000g 4℃离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

● 测定步骤：

- 1、分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。
- 2、工作液的配制: 临用前在试剂二中加入 45mL 试剂一, 充分混匀, 在 25℃孵育 5min; 现配现用。
- 3、测定: 在 1mL 石英比色皿中依次加入 30uL 样本、35uL 试剂三、35uL 试剂四和 900uL 工作液, 混匀; 记录 340nm 处 20 s 时吸光值 A1 和 2 min 20 s 时的吸光值 A2, 计算 $\Delta A=A1-A2$ 。

六、Rubisco 活性计算：

1、按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 25℃中 1 mg 蛋白 1 min 氧化 1 n mol NADH。

$$\text{Rubisco 活力 (nmol/min /mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$$
$$= 2680 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

此法需要测定粗酶液中蛋白质浓度, 建议选购本公司生产的 BCA 蛋白质浓度测定试剂盒 (ZC-S0470)。

2、按样本鲜重计算

单位的定义: 25°C 中 1 g 组织 1 min 氧化 1 nmol NADH。

$$\text{Rubisco 活力 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$$
$$= 2680 \times \Delta A \div W$$

上述计算公式中各符合含义: $V_{\text{反总}}$: 反应体系总体积, $1 \times 10^{-3} \text{L}$; ϵ : NADH 摩尔消光系数, $6.22 \times 10^3 \text{L} / \text{mol} / \text{cm}$; d : 比色皿光径, 1cm; $V_{\text{样}}$: 加入样本体积, 0.03 mL; $V_{\text{样总}}$: 加入提取液体积, 1 mL; T : 反应时间, 2 min; W : 样本质量, g。